

Influence des oryzanols de l'huile de son de riz sur la désacidification enzymatique des corps gras hyperacides

A. DUCRET, M. PINA, D. MONTET et J. GRAILLE (1)

Résumé. — La désacidification par réestérification enzymatique mise au point sur des huiles hydrolysées modèles puis appliquée avec succès à l'huile de palme brute, n'est pas applicable directement à l'huile de son de riz, à cause notamment de la fraction non glycéridique de cette huile.

Cette fraction contient en particulier des esters de l'acide ferrulique avec des alcools triterpéniques appelés « oryzanols » qui ont l'inconvénient de se fixer probablement sur la résine servant de support au biocatalyseur.

L'influence de ces « oryzanols » a été étudiée sur une huile modèle acide reconstituée par addition de ces derniers, soit sous forme native en les apportant en solution dans leur matrice naturelle, l'huile de son de riz, soit sous forme isolée en les apportant par la fraction « insaponifiable » de l'huile de son de riz.

INTRODUCTION

Dans un précédent article, nous avons montré que les techniques biotechnologiques peuvent être appliquées utilement à la réduction enzymatique de l'acidité des huiles hyperacides, comme le sont un certain nombre d'huiles tropicales et en particulier l'huile de son de riz. Ces huiles tropicales sont difficilement raffinables à cause de l'acidité trop élevée pour deux raisons essentielles : la forte teneur en savons après l'étape de neutralisation provoque d'une part la formation d'émulsions irréductibles, et d'autre part, en corollaire, une perte importante au raffinage, deux inconvénients technologiques majeurs, très préjudiciables d'un point de vue économique.

Ces huiles acides contiennent, par voie de conséquence, de fortes teneurs en glycérides partiels. Certains auteurs [1-3] ont mis en œuvre le traitement de ces huiles par des lipases en milieu peu hydraté pour permettre la réestérification des glycérides partiels par les acides gras libres. Graille *et al.* [4] pensent qu'un abaissement de l'acidité de ces huiles hyperacides (10 à 30 % d'acidité) jusqu'à un niveau inférieur à 5 % pourrait rendre tout à fait convenable le raffinage à la soude. Cet objectif a été tout récemment atteint par Ducret *et al.* [5] sur des huiles de palme brutes avec des acidités de plus de 10 %, après avoir mis au point des conditions opératoires sur des corps gras acides reconstitués puis sur des huiles brutes fortement hydrolysées. Toutefois, les mêmes conditions opératoires n'ont pu être transposables telles quelles à l'huile de son de riz. L'objet de cet article est de chercher à expliquer cette différence de comportement, imputable *a priori* à la fraction insaponifiable de l'huile de son de riz qui se distingue très fortement des insaponifiables courants des huiles de commodités classiques, par la fraction « oryzanols ».

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Les huiles de son de riz utilisées proviennent de Thaïlande grâce au délégué IRHO en poste à Bangkok. Leur acidité oléique est de 11,3 % et leur teneur en insaponifiable

de 5 %. L'huile de tournesol raffinée provient du marché au détail. Les huiles modèles acides reconstituées seront définies dans la partie expérimentale ; elles sont obtenues à partir de monooléine et d'acide oléique du commerce.

- Biocatalyseur : toutes les réactions ont été effectuées avec le Lipozyme fourni par Novo Industri (lipase de *Mucor miehei* fixée sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions).

- Le dosage de l'acidité des huiles, de la teneur en eau des milieux réactionnels, la quantification des produits de la réaction et les modalités de l'hydrolyse des huiles ont déjà été décrits précédemment [5].

- L'obtention de la fraction insaponifiable des huiles de son de riz est effectuée selon la norme IUPAC [6].

Conditions opératoires de la réaction de désacidification.

La réaction de désacidification enzymatique est effectuée selon des conditions opératoires décrites précédemment [5] adaptées à partir de celles de Muderhwa *et al.* [7-10] relatives au biofaçonnement des huiles végétales par interestérification régiosélective 1-3 : 4 g de corps gras sont mélangés en l'état fondu c'est-à-dire sans solvant avec 0,16 g de biocatalyseur, soit un rapport pondéral biocatalyseur/substrat = 0,04. Le taux d'hydratation du milieu réactionnel est de 0,4 % correspondant à l'eau du biocatalyseur (10 % de son poids) ; l'activité de l'eau de ce milieu mesurée à 25 °C est $a_w = 0,43$.

Les quantités d'insaponifiable des huiles de son de riz ajoutées seront indiquées tout au long de la discussion. La réaction est effectuée à 60 °C pendant 24 heures dans un ballon fixé à un évaporateur rotatif, sous une pression de 100 mm de Hg et avec une agitation rotative réglée à 100 tr/min.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Il est connu que l'huile de son de riz présente la particularité d'avoir une fraction insaponifiable très importante de l'ordre de 5 % en poids [11] dont près de 2 % sont représentés par une fraction dite « oryzanols », constituée par un mélange complexe d'esters de l'acide ferrulique. Or, l'on sait

(1) Division Chimie des Corps Gras du CIRAD-IRHO, BP 5035, 34032 Montpellier, France

depuis longtemps que l'oryzanol s'adsorbe sur les résines échangeuses d'anions [12, 13]. Il peut donc dans ce cas intervenir directement sur l'efficacité du biocatalyseur. On peut donc concevoir que c'est peut-être à ce niveau que l'on doit chercher l'explication de l'efficacité limitée du biocatalyseur.

Influence de l'insaponifiable après extraction.

Pour juger de l'influence de l'insaponifiable de l'huile de son de riz sur la biocatalyse de la réduction de l'acidité de cette huile, l'idéal serait de pouvoir mettre en œuvre la réaction sur un substrat débarrassé lui-même de l'insaponifiable. Mais cette étude est impossible car l'extraction de l'insaponifiable signifie *ipso facto* que l'huile elle-même est saponifiée et donc détruite. De même, rajouter de l'insaponifiable extrait dans de l'huile de son de riz brute ne peut pas non plus convenir dans la mesure où cette dernière contient déjà son insaponifiable natif. L'expérience logique à effectuer consiste donc à rajouter cet insaponifiable sur un autre substrat acide, et en l'occurrence le corps gras reconstitué ayant donné précédemment d'excellents résultats [5], de préférence à une autre huile brute contenant elle-même son propre insaponifiable. Rappelons que ce corps gras acide reconstitué provient d'un mélange de monooléine et d'acide oléique commerciaux dont la composition est la suivante :

TG = 8,5 %, DG = 25,6 %, MG = 20,9 %, AGL = 45,0 %

Les milieux réactionnels sont consignés dans le tableau I et les résultats dans le tableau II.

Après extraction de l'insaponifiable de l'huile de son de riz, celui-ci a été incorporé à raison de 5 % en poids dans le corps gras acide témoin afin de simuler une huile de son de riz très acide (milieu 2).

TABLEAU I. — Milieux réactionnels contenant de l'insaponifiable extrait de l'huile de son de riz

Milieux n°	1	2	3	4
Corps gras acide (g)	4	4	4	4
Lipozyme (mg)	160	160	160	160
Insaponifiable (mg)	—	200	—	200
Glycérol (mg)	—	—	200	200

Parallèlement, le mélange acide témoin sans insaponifiable (milieu 1) a été enrichi d'une quantité de glycérol théoriquement prévue pour assurer l'élimination de toute l'acidité libre (milieu 3). Il en a été de même pour l'huile simulée obtenue par l'addition d'insaponifiable (milieu 4).

Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, on remarque immédiatement dans le tableau II que dans les 4 cas de figure l'acidité des milieux de réaction a fortement chuté au bout de 24 heures et que l'ajout d'insaponifiable semble a priori n'avoir qu'une influence très relative. Le milieu témoin n° 1 permet de confirmer les résultats obtenus après 24 heures dans les expériences antérieures. On remarquera que l'ajout de glycérol dans le milieu 3 permet d'accroître le taux de désacidification, que les effets inhibiteurs dans les milieux 2 par rapport au 1, et 4 par rapport au 3, sont minimes et du même ordre de grandeur.

Ces résultats sont donc en contradiction avec les prévisions et tout se passe comme si l'inhibition potentielle de la fraction oryzanol n'avait pas pu s'exprimer.

Une réflexion plus approfondie permet de donner une explication à ce résultat déroutant. Dans cette expérience, ce qui est rajouté au mélange acide témoin est en fait de l'insaponifiable extrait de l'huile de son de riz. Celui-ci ne peut donc être assimilé au même insaponifiable *in situ*. L'extraction de l'insaponifiable demande par définition de passer par la saponification de la matière grasse. Dans ce cas particulier, la fraction oryzanol constituée d'esters d'acides ferruliques a donc pu être elle-même transformée et dénaturée. Or, si l'inhibition est apportée par l'insaponifiable *in situ*, elle ne peut plus s'exprimer après son extraction dénaturante.

Influence de l'insaponifiable natif.

Pour pouvoir vraiment juger de l'effet de l'insaponifiable de l'huile de son de riz, il faut impérativement composer un milieu réactionnel contenant de l'insaponifiable natif.

La solution a donc consisté à formuler différents milieux réactionnels à partir du corps gras acide dans lequel on ajoute de l'huile de son de riz brute, afin d'obtenir des substrats contenant des quantités croissantes d'insaponifiable non dénaturé (de 0 à 2,5 % en poids). L'acidité de départ des différents mélanges a été ajustée à 30 % environ en utilisant de l'huile de tournesol raffinée et neutre. Les différents mélanges glycéridiques (4 g) mis en réaction avec 0,16 g de Lipozyme peuvent donc être considérés comme analogues ; la seule variable dans ces conditions est la quantité d'insaponifiable d'huile de son de riz. La composition des milieux réactionnels est détaillée dans le tableau III et les résultats sont consignés dans le tableau IV.

En prenant pour référence le milieu témoin sans insaponifiable d'huile de son de riz pour lequel la diminution

TABLEAU II. — Influence de l'addition d'insaponifiable extrait de l'huile de son de riz

	Milieu 1 (Témoin)	Milieu 2 (Témoin) (+ Insap.)	Milieu 3 (Témoin) (+ glycérol)	Milieu 4 (Témoin) (+ glycérol) (+ Insap.)
Acidité				
à t = 0 (%)	45,0	45,0	45,0	45,0
à t = 24 h (%)	16,1	17,5	13,2	14,6
Désacidification (%)	64,2	61,1	70,6	67,6

TABLEAU III. — Milieux réactionnels pour étudier l'influence de l'insaponifiable natif de l'huile de son de riz

	Milieux glycéridiques (4 g)			
Corps gras acide (g) (Acidité 47,6 %)	2,53	2,38	2,26	2
H de son de riz (g) (Acidité 11,3 %)	0	0,5	1	2
H. de tournesol neutre (g)	1,47	1,12	0,74	0
Insaponifiable (%) H de son de riz	0	0,625	1,25	2,5
Acidité (%)	29,9	30,3	30,2	30,4

TABLEAU IV. — Influence de la fraction insaponifiable native sur l'activité enzymatique

Insaponifiable (%)	0	0,625	1,25	2,5
Acidité à t = 0 (%)	29,9	30,3	30,2	30,4
Acidité à t = 24 h (%)	2,9	6,4	8,5	10,2
Désacidification (%)	90,3	78,9	71,9	66,5
Activité relative	1	0,87	0,79	0,73

d'acidité est de près de 90 %, on constate que l'augmentation progressive de l'insaponifiable natif d'huile de son de riz, donc de la quantité d'oryzanols dans le milieu réactionnel, s'accompagne d'une diminution sensible de l'efficacité de la désacidification. Si l'on définit pour le témoin une activité de désacidification de 1, l'insaponifiable d'huile de son de riz présent à 2,5 % entraîne jusqu'à 25 % de perte d'activité. Il faut donc convenir que la fraction « oryzanols » a une nette influence sur la biocatalyse de la réaction.

Nous avons essayé de compléter cette expérience en hydrolysant l'huile de son de riz brute jusqu'à un taux d'acidité de 30 % avec élimination de l'eau par entraînement azéotropique pour éviter la perte du glycérol lors de la récupération de la phase grasse. Ce substrat hydrolysé permet donc d'obtenir un milieu réactionnel contenant 5 % d'insaponifiable natif, proportion maximale que l'on peut attendre, sans altérer l'insaponifiable natif.

Désacidifiée dans les conditions réactionnelles précédentes, l'acidité oléique résiduelle de l'huile de son de riz hydrolysée est encore de 23 % pour 30 % au départ après 24 heures de réaction. Donc, si l'on fait le même calcul que précédemment, pour 5 % d'insaponifiable, l'activité relative n'est plus que de 0,26 soit une réduction de 75 % de l'activité biocatalytique.

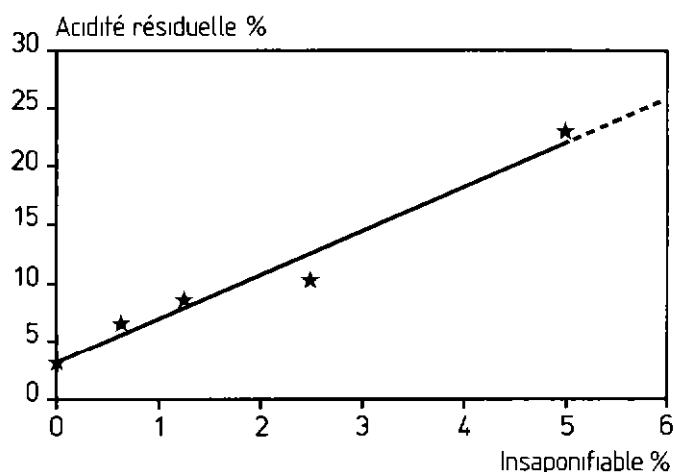


FIG 1 — Relation entre l'acidité résiduelle et la proportion d'insaponifiable natif d'huile de son de riz dans les milieux réactionnels.

La représentation graphique met en évidence la proportionnalité linéaire entre l'acidité résiduelle et la quantité d'insaponifiable natif de l'huile de son de riz (Fig. 1).

Il paraît donc logique de penser que les oryzanols sont les responsables de cette perte d'activité enzymatique. Comme cela a été expliqué auparavant, cette inefficacité serait due à l'adsorption des esters de l'acide ferrulique sur la résine du Lipozyme. De ce fait, ces esters bloqueraient la réaction en s'opposant au contact Lipozyme-substrat par encombrement stérique. Les oryzanols se comporteraient donc de la même façon qu'un inhibiteur compétitif bien que ce ne soit pas véritablement le cas puisque l'effet ne se produit pas au niveau de l'enzyme proprement dit mais au niveau du support.

Compte tenu de ces résultats, certaines modifications des conditions opératoires pourraient être envisagées, notamment en ce qui concerne le biocatalyseur. Ces modifications pourraient tout d'abord porter directement sur le Lipozyme : on peut concevoir d'augmenter la proportion pondérale de celui-ci afin d'ajouter dans le milieu réactionnel une quantité suffisante de « piège à oryzanols » ; cependant, il est à craindre que la teneur en eau souhaitée pour la réaction ne soit plus respectée. On pourrait également envisager d'éliminer la fraction « oryzanols » en la fixant sur la résine vierge, avant d'ajouter le Lipozyme. On pourrait enfin essayer de fixer la lipase de *Mucor miehei* sur un autre support inerte vis-à-vis des esters ferruliques. Par la suite, on pourrait envisager de changer de biocatalyseur, encore qu'il paraisse difficile de trouver une enzyme aussi performante en réestérification.

Remerciements. — Ce travail a pu être réalisé grâce à l'aide du Conseil Général de l'Hérault (contrat n° 88-461), au sein duquel nous tenons à remercier plus particulièrement le Professeur Y. Pietrasanta (ENSC Montpellier, France).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KURASHIGE J. — Proc. World Conf. Emerging Biotechnol. Fats Oils Ind., Hambourg T. H. APPLEWHITE (ed.), Am. Oil Chem. Soc., (1987), 138-141.
- [2] BHATTACHARYYA S., BHATTACHARYYA D. K., CHAKRABORTY A. R. et SENGUPTA R. — Fat Sci. Technol., (1989), 91, 27-30.
- [3] BHATTACHARYYA S. et BHATTACHARYYA D. K. — J. Am. Oil Chem. Soc., (1989), 66, 1469-1471.
- [4] GRAILLE J., PINA M. et MONTET D. — Oléagineux, (1988), 43, 181-190.
- [5] DUCRET A., PINA M., MONTET D. et GRAILLE J. — Oléagineux, (1989), 45, 603-607.
- [6] IUPAC. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Proposed by C. Paquot and A. Haulfenne. Section 2, 2-201. 7th ed. Blackwell Scientific Publication - Oxford - (1987).

- [7] GRAILLE J., MUDERHWA J. et PINA M. — *Fett Wissensch. Technol.*, (1987), **89**, 224-226
- [8] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. — *Oléagineux*, (1988), **43**, 385-392
- [9] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. — *Oléagineux*, (1988), **43**, 427-473
- [10] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. — *Oléagineux*, (1988), **43**, 465-470
- [11] GAYDOU E. M., RAONIZAFINIMANANA R. et BIANCHINI J. P. — *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1980), **57**, 141-142.
- [12] INOUE H. et NOGOCHI T. — *Yakagaku J. Jap. Oil Chem. Soc.* (1962), **11**, 45-51
- [13] INOUE H. et NOGOCHI T. — *Yakagaku J. Jap. Oil Chem. Soc.* (1962), **11**, 109-112

SUMMARY

The effect of rice bran oil oryzanols on enzymatic deacidification of hyperacid oils.

A. DUCRET, M. PINA, D. MONTET and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 3, p. 135-138.

Deacidification by enzymatic re-esterification, developed on hydrolized oil models and then successfully applied to crude palm oil, is not directly applicable to rice bran oil, principally due to the oil's non-glyceride fraction. In particular, this fraction contains esters of ferulic acid with triterpene alcohols, called oryzanols, which are suspected of having the drawback of fixing themselves onto the resin used as the biocatalyst support. The effect of these « oryzanols » was studied using an acid oil model reconstituted by adding oryzanols, either in a natural form, in solution in their natural matrix, or in isolated form, added to the « non-saponifiable » fraction of rice bran oil.

RESUMEN

Influencia de orizanoles del aceite de salvado de arroz en la desacidificación enzimática de grasas hiperácidas.

A. DUCRET, M. PINA, D. MONTET y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 3, p. 135-138

La desacidificación por nueva esterificación enzimática, que ha sido desarrollada en aceites hidrolizados modelos, y luego se aplicó con éxito al aceite crudo de palma, no es directamente aplicable al aceite de salvado de arroz, principalmente por causa de la fracción no glicerídica de este aceite. Esta fracción contiene entre otras cosas ésteres del ácido ferúlico con alcoholes triterpénicos llamados « orizanoles », que tienen el inconveniente de fijarse probablemente en la resina que sirve de soporte al biocatalizador. La influencia de estos orizanoles se estudio en un aceite modelo ácido reconstituido por adición de éstos, ya sea bajo la forma nativa añadiéndose éstos en solución en su matriz natural, que es el aceite de salvado de arroz, o bajo una forma aislada, proporcionándolos por medio de la fracción llamada « insaponificable » del aceite de salvado de arroz.

BON DE COMMANDE NUMÉROS SPÉCIAUX

A retourner à : *return to* : reexpidase a :

OLÉAGINEUX - 11, Square Pétrarque, 75116 Paris (France) — Tél. : (1) 45 53 60 25 — Téléc. : 630491 — Télécopie : 45 53 68 11

Nom (*Name* - Nombre)

Adresse (*Address* - Dirección)

.....

.....

Doc. Quantité Prix de vente (*Sale price* - Precio de venta) date 198
(*Quantity* - Cantidad) FRANCE (TTC) ETRANGER
Signature :

A	..	68 FF	72 FF.
B	94 FF	102 FF.
C	104 FF	123 FF.
D	84 FF	82 FF.
E	225 FF	245 FF.

Règlement par chèque bancaire (*Enclose bank cheque made out to* - Pago por cheque bancario a) :

IRHO-OLÉAGINEUX

Banque Nationale de Paris — Agence Kléber — 51, avenue Kléber, 75116 Paris (France) — RIB : 30004 — 00892 — 00000430596 — clé 21